

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 1/20	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특 1999-0079916 1999년 11월 05일
(21) 출원번호	10-1998-0012807	
(22) 출원일자	1998년 04월 10일	
(71) 출원인	대한민국(관리부서: 농촌진흥청)	김강권
(72) 발명자	경기도 수원시 권선구 서둔동 250번지 구본성 경기도 수원시 권선구 권선동 신우아파트 701동 803호 이승범 경기도 수원시 권선구 서둔동 동남아파트 5동 504호 변명옥 서울특별시 서초구 반포1동 주공아파트 356동 302호 류진창 경기도 수원시 권선구 구운동 강남아파트 3동 608호	
(74) 대리인	윤동열, 이선희	

심사청구 : 있음

(54) 식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 바실러스 서브틸리스 A405 균주 및 이를 이용한 식물병의 방제방법

요약

본 발명은 식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 신규한 미생물 및 이를 이용한 식물병의 방제방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물에 병을 일으키는 병원균에 대한 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405 및 이를 이용하여 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다. 효과적으로 식물병을 방제하기 위하여 식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 신규균주 바실러스 서브틸리스 A405 균주를 미생물 제제로 만들어 사용하거나 상기 균주가 생산하는 항균 펩티드를 대량으로 생산하여 방제하고자 하는 식물의 재배지에 살포함으로써 저렴한 비용을 들여 용이하게 식물병 발생을 억제할 수 있다.

도면

도 5

도 6

도면의 간단한 설명

- 도 1은 A405 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과이다.
- 도 2는 95종의 상이한 탄소원에 대한 생화학적 능력을 검정한 A405 균주의 Biolog 분석결과이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405 균주(KFCC-11024)가 생산하는 항균 펩티드의 전기영동사진이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)가 생산하는 항균 펩티드의 아미노산을 분석한 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)의 식물 병원균에 대한 방제활성을 검정한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)가 생산하는 항균 펩티드의 식물 병원균에 대한 방제활성을 검정한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)가 생산하는 항균 펩티드의 농도에 따른 식물 병원균 생육저지 효과를 나타낸 도면이다.

발명의 상세한 설명

## 발명의 목적

### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 신규한 미생물 및 이를 이용한 식물병의 방제방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물에 병을 일으키는 병원균에 대한 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405 균주 및 이를 이용하여 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

우리나라의 농업은 품종 개량, 토양 비옥도 증진, 병해충 방제 및 잡초 제거 등의 방법으로 부족한 식량을 증산해 왔지만 지속적인 농약의 사용과 남용은 토양과 하천의 오염을 유발하고 농작물에 이들 농약이 잔류함으로써 유발되는 독성, 환경오염 및 인축에 대한 독성 등의 문제를 유발하기 때문에 국내외적으로 농약 사용에 대한 제제 조치가 강화되고 있다.

### 발명이 이루고자하는 기술적 과업

이러한 문제점을 해결하기 위한 대체수단으로, 토양 등에서 분리한 길항 미생물을 직접 또는 제제화하여 생물적으로 방제하는 방법이 시도되고 있다. 이러한 상황에서, 본 발명자들은 환경오염의 폐해가 없으면서, 식물병을 효과적으로 방제하는데 사용할 수 있는 신규 미생물을 제공하고자 예의 연구한 결과로서 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

즉, 본 발명의 목적은 식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성할 수 있는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405 균주를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 식물병에 대해 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성할 수 있는 바실러스 서브틸리스 A405 균주를 식물병에 걸릴 염려가 있거나 또는 식물병에 걸려있는 재배지에 살포함을 특징으로 하는 식물병의 방제방법을 제공하는 것이다.

## 발명의 구성

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스 A405 균주는 토양으로부터 분리되었으며, 분리 방법은 통상의 방법으로 실시할 수 있다.

본 발명의 바실러스 서브틸리스 A405 균주는 식물병 공팡이에 대하여 항균력이 매우 강하고 인체에 무해하며 열안정성이 있는 항균 펩티드를 생성하는 미생물로서 미생물 그 자체나 혹은 항균 펩티드를 대량 생산하여 발생지에 살포함으로써 저렴한 비용을 들여 용이하게 식물병 발생을 억제할 수 있다.

이하, 실시예에 의거 본 발명의 균주의 동정 및 본 발명의 균주의 식물병 방제 활성의 검정에 대해 설명한다.

### 실시예 1. 항균 펩티드 생성 미생물의 분리

토양으로부터 분리한 길항균 중에서 딸기잿빛곰팡이 병원균(*Botrytis cinerea*) 및 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*)의 성장을 억제하는 항균 펩티드 생성 균주를 선별하기 위하여, 길항균들을 박토트립톤 1%, 박토 효모 추출물 0.5%, 및 NaCl 1%를 포함하도록 구성된 LB broth로 28℃온도에서 4일간 배양한 후 7,000rpm으로 20분동안 원심분리하여 상등액만 취하였다. 상등액에 황산암모늄을 80% 포화도로 부가하여 고분자 물질을 침전시킨 후, 침전된 고분자 물질들을 투석하고 centriprep-10으로 농축한 다음 5분간 가열하였다.

이후, 상기한 배양액, 상등액 및 생성된 고분자물질을 5분간 가열한 후에도 파괴되지 않고 남아있는 고분자물질의 병원균에 대한 항균역가를 측정하고 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

	<i>Botrytis cinerea</i> (딸기곰팡이병원균)			<i>Fusarium oxysporum</i> (시들음병원균)		
균주	배양액	상등여액	가열여액	배양액	상등여액	가열여액
3-17	++	-	-	+	-	-
3-18	+	+	+	-	-	-
5-03	+	-	-	-	-	-
13-08	+	-	-	+	-	-
15-04	++	-	-	-	-	-
17-13	++	+	+	-	-	-
A109	-	-	-	-	-	-
A405	++	++	++	++	+	-
SC8	++	++	+	+	+	-
S17	-	-	-	-	-	-
* + : 항균력 약함      - : 항균력 없음 ++ : 항균력 보통 +++ : 항균력 매우 셈						

표 1로부터, 딸기잿빛곰팡이 병원균 및 시들음 병원균에 대한 항균효과가 가장 우수한 균주인 A405를 선발하였다.

선발된 A405 균주가 딸기곰팡이 병원균 및 시들음 병원균이외에 다른 병원균들에 대해서도 항균활성을 나타내는지 알아보기 위해 항균 스펙트럼을 얻은 결과, A405는 하기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 다양한 식물병원균의 생육을 저지시키는 강력한 활성을 나타내는 균주임을 알 수 있다.

[표 2]

시 형 물 질		1gal 활성
균	서코스포라 ( <i>Cercospora</i> sp.)	++
	포니실리움 디지털툼 ( <i>Ponicillium digitatum</i> )	++
	셀레토티리움 글로에오스포리오디즈 ( <i>Cellototrichum gloeosporiodes</i> )	++
	라이조크토니아 솔라니 ( <i>Rhizoctonia solani</i> )	++
	피티움 알티무 ( <i>Pythium ultimum</i> )	++
	피라쿨라리아 오리재 ( <i>Pvricularia oryzae</i> )	+++
박테리아	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	++
	슈도모나스 토라시이 ( <i>Pseudomonas tolaasii</i> )	++
	바실러스 서브틸리스 pB2 ( <i>Bacillus subtilis</i> pB2)	++
효모	칸이나 알비칸스 ( <i>Candida albicans</i> )	++

## 실시예 2. 균주의 동정

상기에서 선발한 A405 균주의 동정은 균의 형태적 특성, 구조적 특성, 생육 특성, 생화학적 특성 및 16S rDNA의 염기서열 분석에 의해 이루어졌다.

### · 형태적 특성

균의 형태는 그림 양성균이다.

### · 구조적 특성 및 생육 특성은 표 3과 같다.

[표 3]

구조적 특성	운동성	+
	포자형성	+
	형상	간균
	Cell 크기	0.74 $\mu$ m × 2.6 $\mu$ m
생육특성	공기중에서의 증식	+
	50℃에서의 증식	+
	55℃에서의 증식	△
	7% NaCl 배지에서의 증식	+
	10% NaCl 배지에서의 증식	+
	전분분해	+

### · 16S rDNA의 염기서열 분석

A405 균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1로부터 A405 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 99% 정도의 상동성을 나타냄을 알 수 있다.

### · 탄소원 이용에 근거한 생화학적 능력 검증

A405 균주의 다양한 탄소원 이용에 근거한 Biolog GP 마이크로플레이트로 분석하여 데이터베이스(MicroLog GP)에서 검정한 결과를 도 2에 나타내었다. 따라서, 도 2로부터 A405 균주는 바실러스 서브틸리스와의 유사성이 0.699임을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 항균활성이 가장 우수한 A405 균주를 동정한 결과, 이 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명자들은 이 균주를 '바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405'로 명명하고, 1998년 3월 30일자로 한국 중균협회 부설 한국 미생물보존센터(KFCC)에 기탁하여 수탁번호 KFCC-11024를 부여받았다.

## 실시예 3. 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)가 생산한 고분자 물질의 동정

바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)를 박토트립톤 1%, 박토 효모 추출물 0.5%, 및 NaCl 1%를 포함하도록 구성된 LB broth로 28℃온도에서 4일간 배양한 다음 7,000rpm으로 20분동안 원심분리하여 상등액만 취한 후, 상등액에 황산암모늄을 20~40% 포화도로 부가하여 고분자 물질을 침전시키고 투석시켰다. 그 다음 이 고분자 물질을 트리스-트리친 펩티드(Tris-tricine peptide) 전기영동으로 영동한 결과, 이 고분자 물질은 분자량이 약 3,000달톤인 펩티드임을 알 수 있었다(도 3 참조). 또한, 이 고분자 물질을 6N HCl로 110℃에서 산 가수분해한 후 아미노산 분석기로 분석한 결과, 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 아스파라긴산, 글리신, 세린, 글루탐산, 발린, 루이신, 프롤린, 이소류이신, 티로신의 9가지 아미노산으로 구성된 펩티드임을 알 수 있었다.

## 실시예 4. 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)의 항균효과 측정

필터페이퍼를 준비한 후, 중앙에 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*)을 접종하고 필터페이퍼의 가장자리에 상기 표 1에서 수집된 균주 중 5종(3-18, 13-08, 17-13, A109 및 SC8)과 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)를 취하여 26~28℃에서 접종하였다. 그 결과, 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)에 의해 병원균의 성장이 억제되었다. 딸기잰빛 곰팡이 병원균(*Botrytis cinerea*)에 대하여, 동일한 방법에 의해 항균효과 측정시험을 해 본 결과, 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)에 의해 병원균의 성장이 억제되었다.

## 실시예 5. 바실러스 서브틸리스 A405 균주(KFCC-11024)에서 생산된 항균 펩티드의 항균효과 측정

4개의 필터페이퍼를 준비한 후, 각각의 중앙에 포니실리움 디지털툼(*Ponicillium digitatum*), 피라클라리아 오리재(*Pyricularia oryzae*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 서코스포라(*Cercospora* sp.)를 놓고 가장자리측에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) A405 균주(KFCC-11024)에서 생산된 항균 펩티드를 접종시킨 결과, 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 4종의 병원균 모두의 성장이 억제되었다.

한편, 항균 펩티드의 최저항균 농도를 측정한 결과, 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 20 $\mu$ g/ml일 때에도 식물병원균의 생육을 저해할 수 있음을 알 수 있었다.



FIG 2

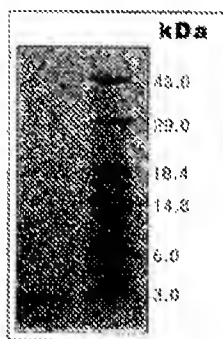
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	<100>	<167>	<366>	<382>	1	5	680	-9	26	32	33
B	9	-18	(42)	<158>	<437>	-12	8	-17	<179>	<134>	<499>	5
C	5	-11	<317>	<249>	(39)	<319>	28	(35)	-5	-10	<237>	(80)
D	(70)	-6	<280>	<327>	<215>	?	(83)	5	?	<97>	<179>	<510>
E	24	<241>	<347>	0	(37)	-8	-17	5	-5	-3	(30)	25
F	-5	18	12	-30	(46)	<467>	680	-32	<233>	(37)	(71)	<113>
G	0	(80)	<117>	(36)	<86>	(75)	15	18	<81>	12	-13	<68>
H	<114>	(58)	<90>	<113>	<99>	15	19	(35)	31	16	(61)	(58)

HTO-NUMBER : 3600-0616-1503-5607-3000-0113-3311-7600

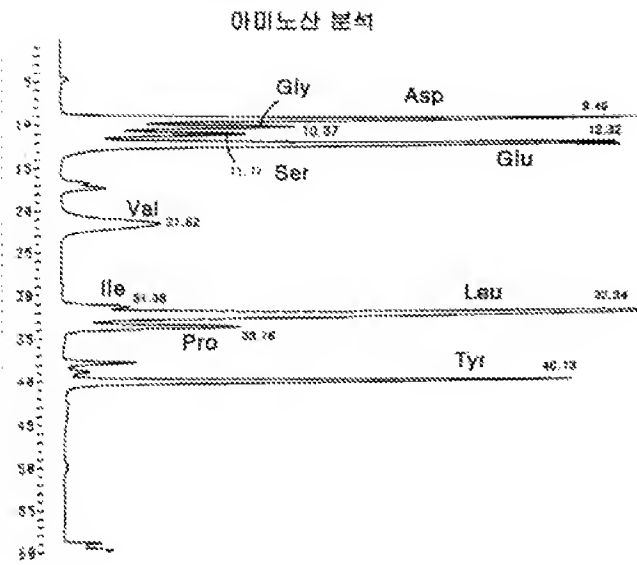
© IDENTIFICATION, "SIM" < 0.75. READ AGAIN AT 6 HOURS (4 HOUR DATA BASE)  
OR AFTER OVERNIGHT INCUBATION (24 HOUR DATA BASE)

CLOSEST SPECIES	SIM	DIST	AVG	MAX
1) BACILLUS SUBTILIS	0.699	3.972	0.750	2.638
2) BACILLUS SUBTILIS VAR GLORIGII	0.029	5.017	0.063	0.119
3) BACILLUS ALCALOPHILUS SS HALORUBENS	0.004	5.648	0.000	1.100
4) BACILLUS PASTEURII	0.001	6.097	0.438	1.569
5) BACILLUS AZOTOFORMANS	0.000	7.155	0.063	0.119
6) BACILLUS THERMOCALCULOSIDASTICUS(55)	0.000	7.376	1.663	1.606
7) BACILLUS THURINGIENSIS/CEREUS	0.000	8.707	0.538	2.469
8) BACILLUS CEREUS/THURINGIENSIS	0.000	10.167	0.333	0.729
9) BACILLUS MYCOTIDES	0.000	10.227	0.438	2.688
10) BACILLUS LICHNERIFORMIS	0.000	10.492	1.000	2.325
other :				

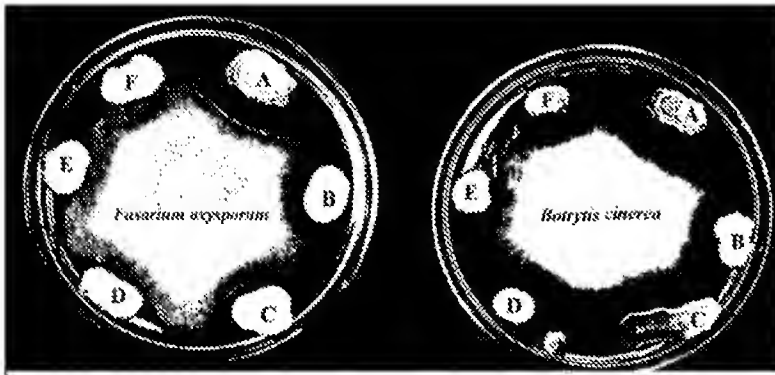
FIG 3



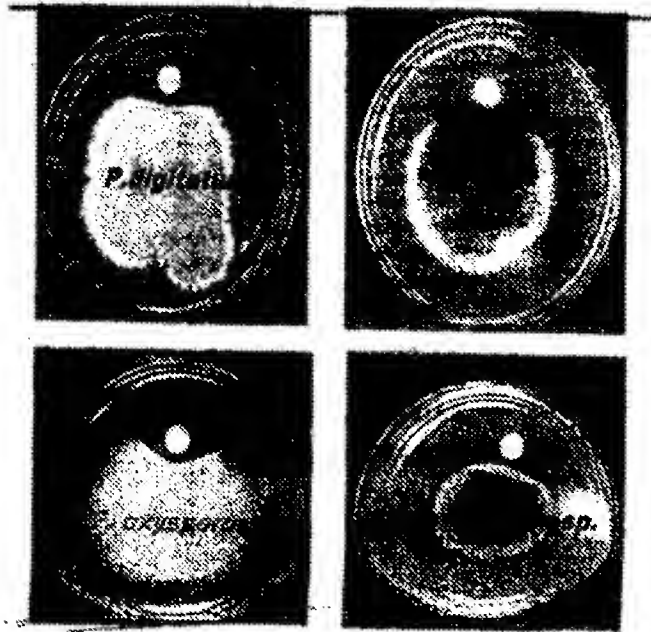
도면4



도면5



도 86



도 87

